

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAÎTÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
19 février 2004 (19.02.2004)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2004/014347 A1

(51) Classification internationale des brevets⁷ : **A61K 9/51, 9/16**

(74) Mandataire : **NONY & ASSOCIES; 3 Rue de Penthièvre, F-75008 Paris (FR).**

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2003/002299

(81) États désignés (*national*) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(22) Date de dépôt international : 21 juillet 2003 (21.07.2003)

(25) Langue de dépôt : **français**

(26) Langue de publication : **français**

(30) Données relatives à la priorité :
02/09436 25 juillet 2002 (25.07.2002) FR

(84) États désignés (*régional*) : brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Déposant (*pour tous les États désignés sauf US*) : **CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE [FR/FR]; 3, rue Michel-Ange, F-75794 Paris Cedex 16 (FR).**

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (*pour US seulement*) : **DEL-LACHERIE, Edith [FR/FR]; 15, rue Jean Ploussard, F-54220 Malzeville (FR). LEONARD, Michèle [FR/FR]; 471, rue de la libération, F-54230 CHALIGNY (FR). GREF, Ruxandra [FR/FR]; 14, rue Moulin Fidel, F-92350 Le Plessis Robinson (FR). NETTER, Patrick [FR/FR]; 26, rue de Cronstadt, F-54000 Nancy (FR). PAYAN, Elisabeth [FR/FR]; 5, route de Lagney, F-54570 Trondes (FR).**

Publiée :

- avec rapport de recherche internationale
- avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

WO 2004/014347 A1
(54) Title: PARTICLES WHICH ARE SURFACE COATED WITH HYALURONAN OR ONE OF THE DERIVATIVES THEREOF AND THE USE OF SAME AS BIOLOGICAL VECTORS FOR ACTIVE SUBSTANCES

(54) Titre : CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

(57) Abstract: The invention relates to particles comprising a core based on at least one biodegradable organo-soluble polymer. The inventive particles are characterised in that at least part of the surface thereof is coated with at least one hyaluronan or one of the derivatives thereof, said hyaluronan being a water-soluble, amphiphilic hyaluronan of which the carboxylic functions are in part transformed in order to form hydrophobic groups.

(57) Abrégé : « Particules revêtues en surface de hyaluronane ou d'un de ses dérivés et leur utilisation à titre de vecteurs biologiques pour des matières actives » La présente invention concerne des particules dont le cœur est à base d'au moins un polymère organo-soluble biodégradable, caractérisées en ce qu'elles sont revêtues, au moins partiellement en surface d'au moins un hyaluronane ou de l'un de ses dérivés, ledit hyaluronane étant un hyaluronane amphiphile, hydrosoluble et dont les fonctions carboxyliques sont en partie transformées pour figurer des groupes hydrophobes.

Particules revêtues en surface de hyaluronane ou d'un de ses dérivés et leur utilisation à titre de vecteurs biologiques pour des matières actives

La présente invention concerne principalement des particules revêtues au moins partiellement en surface de hyaluronane ou dérivé et l'utilisation de ces particules à 5 titre de vecteurs biologiques pour des matières actives.

La vectorisation est une opération visant à moduler et si possible à totalement maîtriser la distribution d'une substance, en l'associant à un système approprié appelé vecteur.

Dans le domaine de la vectorisation, trois fonctions principales sont à assurer :

- 10 - transporter la ou les matières actives dans les liquides biologiques de l'organisme,
- acheminer les matières actives vers les organes à traiter, et
 - assurer la libération de ces matières actives.

A ces trois fonctions, s'ajoute une exigence de biodisponibilité du vecteur. Il 15 doit être biodégradable et ses sous-unités doivent être tolérées par l'organisme.

En fait, le devenir *in vivo* du vecteur est conditionné par sa taille, ses caractéristiques physico-chimiques et, en particulier, ses propriétés de surface qui, d'une part jouent un rôle déterminant avec les composants du milieu biologique et, d'autre part peuvent induire un comportement ciblé vers un site spécifique à traiter.

20 Les vecteurs biologiques, plus particulièrement concernés dans le cadre de la présente invention, appartiennent au domaine des particules, notamment nano- et micro-particules.

Des nano-particules et micro-particules de poly(acide lactique) (PLA) et/ou de polyester biodégradable dont les produits de dégradation sont des métabolites naturels d'un 25 organisme humain, sont proposées depuis longtemps pour vectoriser des molécules bioactives pour différents types d'administration. Cependant, le caractère hydrophobe de la surface de ces particules ainsi que la présence de groupes carboxylates (extrémités des chaînes de PLA) entraînent une adsorption de protéines plasmatiques, les opsonines, responsables en particulier de la capture des particules par les cellules du Système des 30 Phagocytes Mononucléés (SPM). Il en résulte une disparition rapide des particules du volume circulant en même temps qu'une accumulation dans les organes du SPM (foie, rate, reins).

La présente invention a notamment pour objectif de proposer de nouvelles particules possédant une durée de vie prolongée et particulièrement avantageuses pour véhiculer des matières actives biologiques ou synthétiques, intéressantes dans le domaine de la rhumatologie.

5 Dans ce domaine clinique, le praticien est souvent confronté à des pathologies inflammatoires et/ou dégénératives qui engendrent, à plus ou moins long terme, des dégradations parfois irréversibles du cartilage. Outre des traitements non spécifiques à base d'antalgiques et d'anti-inflammatoires non stéroïdiens, on peut avoir recours, entre autres, à des injections locales de corticoïdes. Les doses élevées de corticoïdes utilisées dans ce
10 cas de figure peuvent, toutefois, induire des effets indésirables non négligeables. Par ailleurs, il est généralement nécessaire de multiplier ces injections en raison d'une action bénéfique trop réduite.

15 L'administration de ce type de matières actives par l'intermédiaire de particules serait donc une alternative particulièrement avantageuse aux thérapies conventionnelles.

En l'occurrence, la présente invention vise notamment à proposer un vecteur de type particules qui, d'une part est biodégradable et approprié au relargage contrôlé d'une matière active et, d'autre part est capable de cibler efficacement la libération de cette matière active au niveau des cellules tissulaires et plus particulièrement des cellules
20 possédant des récepteurs spécifiques aux hyaluronanes, encore dénommés CD44.

Ces récepteurs sont notamment présents au niveau des cellules de la sphère articulaire comme par exemple les chondrocytes et les synoviocytes. Les chondrocytes sont des cellules impliquées dans la synthèse de la matrice cartilagineuse. Elles gèrent également le maintien de l'homéostasie du cartilage. Les synoviocytes qui sont des cellules localisées dans la membrane synoviale, sont pour leur part impliquées dans la synthèse du
25 hyaluronane dans le liquide synoviale.

De manière inattendue, les inventeurs ont mis en évidence qu'il était possible de cibler efficacement le relargage d'une matière active encapsulée dans des particules vers des cellules possédant notamment ce type de récepteur, en les fonctionnalisant en surface
30 avec du hyaluronane.

Un premier aspect de l'invention concerne donc des particules dont le cœur est à base d'au moins un polymère organosoluble biodégradable, caractérisées en ce qu'elles

sont revêtues, au moins partiellement en surface, d'au moins un hyaluronane ou de l'un de ses dérivés.

L'acide hyaluronique est un polysaccharide naturel constitué par une succession de motifs disaccharidiques N-acétylglucosamine/acide glucuronique et dont les 5 solutions aqueuses ont une viscosité élevée. Il est présent notamment dans le cordon ombilical, dans l'humeur vitrée et dans le liquide synovial. Il est également produit par certaines bactéries, notamment par des streptocoques hémolytiques des groupes A et C. La masse molaire de l'acide hyaluronique peut varier de 10 000 à 10 000 000 g environ, selon 10 l'origine. L'acide hyaluronique est commercialisé notamment sous la forme de son sel de sodium (encore dénommé hyaluronate). On utilise le terme générique « hyaluronane » pour désigner indistinctement l'acide hyaluronique et les hyaluronates, notamment sous la forme de sels inorganiques ou organiques et en particulier les sels alcalins et/ou alcalino-terreux.

Plus particulièrement, ce hyaluronane est mis en œuvre sous la forme d'un 15 hyaluronane amphiphile, hydrosoluble dont les fonctions carboxyliques sont en partie transformées de manière à figurer des groupements hydrophobes. La fixation de ces groupements hydrophobes peut notamment être établie par réaction de ceux-ci avec les fonctions carboxyliques du hyaluronate selon une réaction d'estérification ou 20 d'amidification. Cette transformation est effectuée à un taux suffisant pour conférer un comportement amphiphile audit hyaluronane.

La transformation des fonctions carboxyliques du hyaluronate peut ainsi être obtenue par une estérification et/ou amidification partielle de ces fonctions. De tels dérivés sont notamment décrits dans FR 2 794 763.

Les groupes hydrophobes peuvent notamment dériver de l'estérification des 25 fonctions carboxyliques par au moins un groupe choisi parmi :

- des chaînes alkyles, linéaires ou ramifiées, saturées ou insaturées, pouvant être interrompues par un ou plusieurs hétéroatomes comme les atomes de S, O et N, et le cas échéant, substituées par au moins un noyau aromatique, et
 - des oligomères comme ceux dérivant des α -hydroxyacides.

Les chaînes alkyles peuvent posséder un nombre d'atomes de carbone supérieur à 5 et notamment supérieur à 10. Toutefois, dans le cas particulier où une telle chaîne est substituée par un noyau aromatique, son nombre d'atomes de carbone peut être

réduit.

Le taux de transformation est généralement ajusté de manière à préserver une hydrosolubilité suffisante au dérivé hyaluronane amphiphile ainsi obtenu.

Il est également contrôlé en tenant compte de l'hydrophobie des groupes fixés
5 sur le hyaluronane.

D'une manière générale, concernant les chaînes alkyles, plus la chaîne est longue, plus le taux de fixation au niveau du squelette hyaluronane pourra être faible. Inversement, avec des chaînes alkyles courtes, le taux de fixation pourra être plus élevé. Il est clair que cet ajustement entre le taux de fixation et la longueur des chaînes alkyles
10 relève des compétences de l'homme de l'art.

A titre indicatif, pour une chaîne alkyle contenant de 15 à 20 atomes de carbone et en particulier 18 atomes de carbone, le taux d'estérification peut être d'au plus 15 %, voire inférieur à 10 % et, notamment inférieur à 7 % et en particulier compris entre 0,05 et 5 %. Pour une chaîne alkyle contenant de 10 à 14 atomes de carbone et notamment
15 de 12 atomes de carbone, ce taux d'estérification peut être supérieur ou égal à 25 % et pour une chaîne alkyle de 6 atomes de carbone, il peut être de l'ordre de 50 %.

Ce taux de transformation est généralement ajusté de manière à permettre la fixation du dérivé hyaluronane en surface des particules grâce à l'interaction de ses groupements hydrophobes avec la matrice polymérique hydrophobe constituant les
20 particules. En d'autres termes, les chaînes alkyles sont ancrées dans la matrice hydrophobe pendant la formation des particules. Dans le cas de la présente invention, la fonctionnalisation en surface des particules par hyaluronane ne fait pas intervenir de lien covalent ni ionique entre ces deux entités. La fixation du dérivé hyaluronane relève essentiellement d'interactions de type hydrophobe et Van der Waals.

25 Le taux de transformation est également ajusté de manière à ne pas affecter l'affinité naturelle du hyaluronane pour les récepteurs CD44.

La présence de hyaluronane en surface de particules est particulièrement avantageuse pour les diriger sélectivement vers les récepteurs CD44 présents notamment sur les cellules de la sphère articulaire. Grâce à cette enveloppe hyaluronane, les particules,
30 selon l'invention, utilisées à titre de vecteur biologique pour une matière active biologique ou synthétique permettent avantageusement de cibler efficacement la libération de cette matière active au niveau des cellules à récepteurs CD44, par exemple des chondrocytes

et/ou des synoviocytes. Il en résulte une action contrôlée et prolongée de cette matière active au niveau de la lésion visée. Ce dernier aspect est particulièrement intéressant pour le bien-être du patient, dans la mesure où il donne accès à une meilleure disponibilité du médicament et donc, permet de réduire les quantités administrées et leur fréquence
5 d'administration.

La biodégradabilité des particules revendiquées est, par ailleurs, également assurée grâce à la nature des polymères qui les constituent.

Au sens de l'invention, on entend désigner sous l'appellation « biodégradable » tout polymère qui se dissout ou se dégrade en une période acceptable pour l'application à 10 laquelle il est destiné, habituellement en thérapie *in vivo*. Généralement, cette période doit être inférieure à 5 ans et plus préférentiellement à une année lorsque l'on expose une solution physiologique correspondante à un pH de 6 à 8 et à une température comprise entre 25 °C et 37 °C.

Les polymères biodégradables selon l'invention sont ou dérivent de polymères 15 biodégradables synthétiques ou naturels.

Concernant les polymères biodégradables organosolubles utilisables pour constituer le cœur des particules, ils peuvent notamment être choisis parmi les polyesters comme les poly(acide lactique) (PLA), poly(acide glycolique) (PGA), poly(ϵ -caprolactone) (PCL), les polyanhydrides, poly(alkylcyanoacrylates), polyorthoesters, poly(alkylène 20 tarrate), polyphosphazènes, polyaminoacides, polyamidoamines, polycarbonates, polyméthylidène malonate, polysiloxane, le polyhydroxybutyrate ou le poly(acide malique), ainsi que leurs copolymères et dérivés.

Selon une variante particulière de l'invention, les particules revendiquées possèdent une matrice polymérique incorporant au moins un polymère différent du 25 hyaluronane. Plus préférentiellement, cette matrice est constituée d'un ou plusieurs polymères autres que le hyaluronane.

Sont notamment préférés comme polymères organosolubles biodégradables selon l'invention, les polyesters comme les poly(acide lactique), poly(acide glycolique), poly(ϵ -caprolactone), et leurs copolymères, comme par exemple le poly(acide lactique-co-acide glycolique) (PLGA).

Selon une variante particulière de l'invention, les particules sont composées majoritairement c'est-à-dire à plus de 50 % en poids, en particulier plus de 75 % en poids,

voire en totalité, de poly(acide lactique).

Les particules selon l'invention, comprennent de préférence au moins une matière active biologique ou synthétique de type médicament sous une forme encapsulée dans le cœur de polymère.

5 Comme matières actives biologiques, on peut plus particulièrement citer les peptides, les protéines, les carbohydrates, les acides nucléiques, les lipides, les polysaccharides ou leurs mélanges. Il peut également s'agir de molécules organiques ou inorganiques synthétiques, qui, administrées *in vivo* à un animal ou à un patient, sont susceptibles d'induire un effet biologique et/ou manifester une activité thérapeutique. Il
10 peut ainsi s'agir d'antigènes, d'enzymes, d'hormones, de récepteurs, de vitamines et/ou de minéraux.

A titre représentatif et non limitatif des médicaments susceptibles d'être incorporés dans ces particules, on peut citer les composés anti-inflammatoires, les anesthésiants, les agents chimiothérapeutiques, les immunotoxines, les agents
15 immuno-supresseurs, les stéroïdes, les antibiotiques, les antiviraux, les antifongiques, les antiparasitaires, les substances vaccinantes, les immunomodulateurs et les analgésiques.

Dans la mesure où les particules selon l'invention sont avantageusement ciblées vers les cellules de structure tissulaire comme par exemple les chondrocytes et synoviocytes, on peut privilégier l'utilisation à titre de matières actives des composés
20 suivants : les anti-inflammatoires, des composants matriciels comme par exemple les glycosaminoglycans et des facteurs biologiques impliqués dans le processus de régénération et/ou protection du cartilage. Les particules ont notamment pour avantage de protéger efficacement ce type de matière active particulièrement sensibles au phénomène de biodégradation.

25 Il peut également s'agir de composés biologiques plus particulièrement actifs vis-à-vis de l'arthrose comme par exemple la glucosamine des glycosaminoglycans, l'acide hyaluronique, le sulfate de chondroïtine et leurs mélanges.

Les particules conformes à l'invention peuvent comprendre jusqu'à 95 % en poids d'une matière active.

30 La matière active peut ainsi être présente en une quantité variant de 0,001 à 950 mg/g de particule et préférentiellement de 0,1 à 500 mg/g. Il est à noter que dans le cas de l'encapsulation de certains composés macromoléculaires (ADN, oligonucléotides,

protéines, peptides, etc) des charges encore plus faibles peuvent être suffisantes.

Les particules selon l'invention peuvent posséder une taille variant de 50 nm à 600 µm et notamment de 80 nm à 250 µm.

Les particules selon l'invention possédant une taille comprise entre 1 et 5 1000 nm sont dénommées nanoparticules. Les particules dont la taille varie de 1 à plusieurs milliers de microns font référence à des microparticules.

Les particules sont généralement sous forme sphérique, mais peuvent également se présenter sous d'autres formes.

Les nanoparticules ou microparticules revendiquées peuvent être préparées 10 selon des méthodes déjà décrites dans la littérature, et plus particulièrement peuvent être obtenues par la technique d'émulsion/évaporation du solvant et notamment celle décrite par R. Gurny *et al.* « *Development of biodegradable and injectable latices for controlled release of potent drugs* » Drug Dev. Ind. Pharm., vol. 7, p. 1-25 1981.

De manière inattendue, les inventeurs ont ainsi mis en évidence que les 15 hyaluronanes amphiphiles précités pouvaient avantageusement être utilisés à la place des tensioactifs conventionnels pour la préparation de particules selon la technique émulsion/évaporation de solvant.

En fait, deux variantes de cette technique sont considérées selon la nature hydrophobe ou hydrophile de la matière active à encapsuler.

20 Lorsque que l'on cherche à encapsuler une matière active hydrophobe, on prépare une simple émulsion. Pour ce faire, le polymère biodégradable choisi est dissous dans la phase organique, notamment un solvant peu soluble dans l'eau comme par exemple du chlorure de méthylène ou de l'acétate d'éthyle, avec la matière active à encapsuler. Le hyaluronane amphiphile, est pour sa part dissous dans la phase aqueuse qui sert de milieu 25 dispersant à la phase organique. A l'issue du mélange de ces deux phases, le dérivé hyaluronane se localise à l'interface eau/phase organique grâce à ses propriétés amphiphiles et stabilise ainsi l'émulsion. Lors de l'évaporation du solvant organique, les dérivés amphiphiles de hyaluronane demeurent avantageusement fixés à la surface des particules ainsi formées, les groupes hydrophobes étant ancrés plus ou moins 30 profondément dans le cœur de polymère organosolubles formant les particules et la partie hydrophile, correspondant principalement au squelette hyaluronane, étant exposée à la surface. A la fin de l'évaporation du solvant, on récupère des particules conformes à

l'invention qui subissent ensuite un lavage à l'eau, une centrifugation ou une lyophilisation.

Dans le cas où la matière active à encapsuler est hydrophile à l'image des protéines et polysaccharides par exemple, on prépare une première émulsion de type huile dans eau, composée d'une phase organique contenant le polymère organosoluble biodégradable et d'une première phase aqueuse contenant la matière active. Cette émulsion dite inversée est ensuite mise en présence d'une seconde phase aqueuse contenant le dérivé hyaluronane amphiphile de manière à obtenir une double émulsion eau/huile/eau vis-à-vis de laquelle le hyaluronane amphiphile joue le rôle de stabilisant. Après évaporation du solvant, on récupère des particules conformes à la présente invention qui sont traitées comme précédemment.

Les conditions utilisées lors de la préparation des émulsions déterminent généralement la taille des particules et leur ajustement relève des compétences de l'homme de l'art.

L'utilisation d'un dérivé hyaluronane à titre d'agent stabilisant dans ce type de procédé de préparation de particules est donc particulièrement avantageuse à au moins deux titres :

- elle permet de s'affranchir de la présence des agents tensioactifs systématiquement utilisés dans les procédés conventionnels. En l'occurrence, ces derniers ne sont pas toujours biocompatibles et parfois difficiles à éliminer en fin de synthèse ;
- elle conduit à l'issue de la synthèse des particules, à un vecteur manifestant une affinité sélective pour des cellules de structure tissulaire et plus particulièrement pour des cellules de la sphère articulaire et en particulier pour les chondrocytes et les synoviocytes.

La concentration de hyaluronane dans le milieu de synthèse des particules, détermine le taux de recouvrement des particules, c'est-à-dire la quantité de hyaluronane déposée à leur surface. Le dérivé hyaluronane est généralement réparti de manière homogène en surface des particules avec une densité surfacique pouvant varier de manière significative.

On peut également incorporer dans les particules, des composés à finalité de diagnostic. Il peut ainsi s'agir de substances détectables par rayons X, fluorescence, ultrasons, résonance magnétique nucléaire ou radioactivité. Les particules peuvent ainsi

inclure des particules magnétiques, des matériaux radio-opaques, comme notamment le baryum ou des composés fluorescents. Alternativement, des émetteurs gamma (par exemple Indium ou Technetium) peuvent y être incorporés.

Comme décrit précédemment, la matière active est de préférence incorporée 5 dans ces particules lors de leur processus de formation. Toutefois, lorsque cela s'avère possible, elle peut également être chargée au niveau des particules une fois que celles-ci sont obtenues.

Les particules selon l'invention peuvent être administrées de différentes façons, par exemple par voie orale ou parentérale et notamment par voies intra-articulaire, 10 oculaire, pulmonaire, nasale, vaginale, cutanée et/ou buccale.

Les hyaluronanes présents en surface des particules selon l'invention, portant une multitude de fonctions OH réactives, il est en outre possible une fois les particules formées, de fixer à ses fonctions toutes sortes de molécules par des liaisons covalentes. A titre illustratif et non limitatif de ce type de molécules, on peut notamment citer les 15 molécules de type marqueurs et les composés susceptibles de potentialiser la fonction de ciblage assurée par le hyaluronane, comme par exemple des peptides RGD (arginine glycine – acide aspartique) qui favorisent l'adhésion entre les cellules et leurs matrices extracellulaires.

Un second aspect de l'invention concerne un vecteur biologique notamment 20 pour une ou plusieurs matière(s) active(s) biologique(s) ou synthétique(s) comprenant au moins des particules selon l'invention.

L'invention concerne également l'utilisation de ce vecteur, ou des particules revendiquées pour encapsuler au moins une matière active, biologique ou synthétique.

Un autre aspect de l'invention se rapporte à des compositions pharmaceutiques 25 ou de diagnostic comprenant au moins un vecteur et notamment des particules selon l'invention, le cas échéant associé(es) à au moins un véhicule pharmaceutiquement acceptable et compatible.

Comme évoqué précédemment, les particules revendiquées sont particulièrement avantageuses sur le plan pharmaceutique ou du diagnostic.

Elles assurent une protection satisfaisante de la matière active encapsulée. Elles 30 limitent la diffusion de cette matière active dans l'organisme grâce à l'effet stérique des particules en soi et à l'affinité naturelle du hyaluronane pour les récepteurs CD44. Elles

autorisent une libération progressive de cette substance active à proximité de la lésion et/ou des cellules visées permettant ainsi une action prolongée. Enfin, elles se dégradent lentement en produits bien tolérés par l'organisme.

Un autre aspect de la présente invention concerne l'utilisation de particules telles que définies ci-dessus voir d'un vecteur biologique en incorporant pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement de l'arthrose.

Les particules peuvent également être incorporées dans des capsules, ou incorporées dans des implants, gels ou tablettes. Elles peuvent également être formulées directement dans un fluide de type huile par exemple et être injectées directement au niveau du site biologique à traiter.

Un autre aspect de l'invention concerne l'utilisation de hyaluronane ou dérivé amphiphile tel que défini précédemment à titre d'agent de ciblage en surface de particules, en particulier constituées d'au moins un polymère biodégradable ou de capsules, notamment creuses. Ces particules ou capsules peuvent notamment être des nano- ou micro-sphères ou des nano- ou micro-particules.

Les exemples et figures présentés ci-après sont soumis à titre illustratif et non limitatif du domaine de l'invention.

FIGURES :

Figure 1 : Représentation de la prolifération cellulaire de chondrocytes de rats cultivés en système monocouche après 48 h de traitement en présence de nanoparticules à base de PLA (témoin) et de PLA revêtue de hyaluronane amphiphile.

Figure 2 : Représentation de la prolifération cellulaire et activité de synthèse en protéoglycans, de chondrocytes cultivés sur billes d'alginate (culture tridimensionnelle) après 48 heures de traitement en présence de nanoparticules à base de PLA (témoin) et de PLA revêtue de hyaluronane amphiphile.

MATERIEL ET METHODE

Synthèse des HA modifiés

A titre d'exemple, est décrite ci-dessous la synthèse d'un hyaluronane substitué par des chaînes aliphatiques à 18 carbones.

Le hyaluronate de sodium (HA, $\overline{M}_w = 600\,000$ g/mol) provient de la Société

Bioibérica (Barcelone, Espagne).

1 g de hyaluronate de sodium est dissous dans 100 ml d'eau distillée. La solution est mise en contact pendant 15 minutes avec 5 g de résine Dowex 50*8 échangeuse de cations conditionnée en H⁺ à 2,5 meq/g (stoechiométrie 1:6). Après 5 filtration, la solution contenant la forme acide du polysaccharide est neutralisée à pH 7 à l'hydroxyde de tétrabutylammonium, puis lyophilisée. On obtient ainsi le hyaluronate de tétrabutylammonium HA-TBA.

1 g de HA-TBA est dissous dans 100 ml de diméthylsulfoxyde. 36 µl de C₁₈H₃₇Br sont ajoutés. Après 24 h de réaction à 30 °C sous agitation, le mélange est mis en 10 dialyse : 1 jour contre eau distillée, 6 jours contre eau distillée + azide NaN₃ (1/2500) puis 1 jour contre eau distillée. Enfin, la solution dialysée est lyophilisée.

On obtient ainsi un dérivé du hyaluronate de sodium dont environ 4 % des fonctions carboxyliques sont estérifiées par des chaînes à 18 carbones.

15 **EXEMPLE 1 :**

Synthèse et caractérisation de particules conformes à l'invention.

A titre d'exemple, est donné ci-dessous le protocole de synthèse de particules recouvertes du hyaluronate amphiphile HA-C₁₈-1,3 % c'est-à-dire d'un polymère 20 contenant 1,3 chaînes alkyle à 18 carbones pour 100 motifs glucose.

Le poly(D,L-acide lactique) (PLA, $\overline{M_w} = 106\,000\text{g/mol}$) et le dichlorométhane (CH₂Cl₂) sont des produits Sigma-Aldrich (France).

10 mg de HA-C₁₈-1,3 % sont dissous pendant 24 h sous agitation dans 10 ml d'eau distillée. On ajoute 1 ml de CH₂Cl₂ contenant 25 mg de PLA. Une émulsion huile 25 dans eau stable est réalisée par l'utilisation d'un vortex pendant 30 s puis des ultra-sons à une puissance de 10 W en mode pulsé (50 % de cycle actif) pendant 60 s. Le solvant organique est ensuite évaporé sous agitation, à température et pression ambiantes pendant 2 h. La suspension aqueuse de particules ainsi obtenue est lavée à l'eau par 3 centrifugations successives de 10 mn à 12 000 tr/mn.

30 Les particules obtenues dans ces conditions ont un diamètre moyen de 450 nm (diamètre moyen en intensité, déterminé par spectroscopie à corrélation de photons sur un appareil Malvern 4600).

EXEMPLE 2 :**Evaluation biologique *in vitro* des particules conformes à l'invention.**

5 Des chondrocytes (cellules du cartilage) de rats obtenus après digestion de fragments de cartilage par la pronase et par la collagénase, sont mis en culture dans du DMEM (Gibco BRL, RU) en présence de particules obtenues selon l'exemple 1.

Deux systèmes de culture sont utilisés :

10 1) un système en monocouche classique applicable à tous les types cellulaires et qui permet d'appréhender les paramètres généraux de biocompatibilité tels que la viabilité et la prolifération.

Les chondrocytes sont répartis dans des plaques de culture à 24 trous à raison d'environ 100 000 chondrocytes par trou. Une suspension de nanoparticules recouvertes de HA amphiphile et synthétisées selon l'exemple 1, est préparée dans le milieu de culture 15 DMEM de façon à avoir en moyenne environ 10^7 particules par ml. 1 ml de cette suspension est mis en contact avec les chondrocytes dans les trous de culture ce qui donne un ratio moyen d'environ 100 particules par chondrocyte. Le contact est maintenu pendant 48 h.

La figure 1 montre qu'après ce contact de 48 h avec des particules recouvertes 20 de HA amphiphiles substitués à différents taux par des chaînes à 18 ou 12 atomes de carbone, la viabilité et la prolifération des chondrocytes sont similaires à celles obtenues avec le témoin.

En revanche, on peut observer que dans ces conditions expérimentales, la présence des particules de PLA nues modifie significativement ces paramètres.

25 2) un système tridimensionnel : dans le cas des chondrocytes, on complète l'analyse précédente par l'étude d'une culture dans des billes d'alginate de calcium qui sont enrichies ou non en particules conformes à l'invention, afin d'appréhender l'activité de synthèse des protéoglycans du chondrocyte dans cet environnement nano ou microparticulaire.

30 Les culots cellulaires sont suspendus dans une solution d'alginate de sodium à 2 % dans du NaCl stérile 0,9 % et contenant les particules recouvertes de HA, de façon à avoir approximativement 500 000 chondrocytes par ml et en moyenne environ 200

nanoparticules par chondrocyte. La suspension résultante est alors déposée au goutte à goutte dans une solution de CaCl_2 100 mM à l'aide d'une seringue de 2 ml équipée d'une aiguille 0,8x25, ce qui permet de former des billes d'environ 2 mm de diamètre au contact du CaCl_2 . Après repos de 20 mn dans la solution de CaCl_2 , les billes sont lavées 2 fois de suite par du NaCl 0,9 %.

La figure 2 montre que le contact avec des nanosphères recouvertes de HA amphiphiles substitués à différents taux par des chaînes à 18 ou 12 atomes de carbone, ne perturbe pas significativement la prolifération et l'activité métabolique des chondrocytes dans cet environnement.

REVENDICATIONS

1. Particules dont le cœur est à base d'au moins un polymère organosoluble
5 biodégradable, caractérisées en ce qu'elles sont revêtues, au moins partiellement en surface d'au moins un hyaluronane ou de l'un de ses dérivés, ledit hyaluronane étant un hyaluronane amphiphile, hydrosoluble et dont les fonctions carboxyliques sont en partie transformées pour figurer des groupes hydrophobes.
2. Particules selon la revendication 1, caractérisées en ce que les groupes
10 hydrophobes sont fixés au hyaluronane par des fonctions esters et/ou amides.
3. Particules selon la revendication 1 ou 2, caractérisées en ce que les fonctions carboxyliques sont en partie estérifiées à l'aide d'au moins un groupe choisi parmi des chaînes alkyles, linéaires ou ramifiées, saturées ou insaturées pouvant être interrompues par un ou plusieurs hétéroatomes et le cas échéant substituées par un noyau
15 aromatique et des oligomères dérivant d' α -hydroxyacides.
4. Particules selon la revendication 3, caractérisées en ce que les chaînes alkyles possèdent un nombre d'atomes de carbone supérieur à 5 et notamment supérieur à
10.
5. Particules selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisées en
20 ce que lorsque les chaînes alkyles possèdent un nombre d'atomes de carbone variant de 15 à 20, le taux d'estérification est d'au plus 15 %.
6. Particules selon la revendication 5, caractérisées en ce que le hyaluronane est estérifié par une chaîne alkyle possédant 18 atomes de carbone.
7. Particules selon la revendication 6, caractérisées en ce que le taux
25 d'estérification est inférieur à 7 %.
8. Particules selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisées en ce que lorsque les chaînes alkyles possèdent un nombre d'atomes de carbone variant de 10 à 14, le taux d'estérification est supérieur ou égal à 25 %.
9. Particules selon l'une quelconque des revendications précédentes,
30 caractérisées en ce que le polymère organosoluble biodégradable est ou dérive d'un polymère biodégradable synthétique ou naturel.
10. Particules selon l'une quelconque des revendications précédentes,

caractérisées en ce que le polymère organosoluble biodégradable est un polymère choisi parmi les polyesters de type poly(acide lactique), poly(acide glycolique), poly(ϵ -caprolactone), les polyanhydrides, poly(alkylcyanoacrylates), polyorthoesters, poly(alkylène tartrate), polyphosphazènes, polyaminoacides, polyamidoamines, 5 polycarbonate, polyméthylidènemalonate, polysiloxane, polyhydroxybutyrate, poly(acide malique), leurs copolymères ou dérivés.

11. Particules selon l'une quelconque des revendications 1 à 10, caractérisées en ce que le polymère organosoluble biodégradable est choisi parmi le poly(acide lactique), poly(acide glycolique), poly(caprolactone) et leurs copolymères.

10 12. Particules selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisées en ce qu'elles comprennent en outre au moins une matière active biologique ou synthétique encapsulée dans le cœur de polymère.

13. Particules selon la revendication 12, caractérisées en ce que la matière active encapsulée est au moins une matière biologique choisie parmi les peptides, 15 protéines, carbohydrates, acides nucléiques, lipides, polysaccharides, antigènes, enzymes, hormones, récepteurs, vitamines, les composants matriciels comme par exemple les glycosaminoglycans, les facteurs biologiques impliqués dans le processus de régénération et/ou protection du cartilage, dans l'arthrose et leurs mélanges.

14. Particules selon la revendication 13, caractérisée en ce que la matière active encapsulée est choisie parmi les glucosamine, acide hyaluronique, sulfate de chondroïtine et leurs mélanges.

15. Particules selon la revendication 12, caractérisées en ce que la matière active est une au moins matière active synthétique notamment de type médicament choisie parmi les composés anti-inflammatoires, anesthésiants, agents chimiothérapeutiques, 25 immunotoxines, agents immunosuppresseurs, stéroïdes, antibiotiques, antiviraux, antifongiques, antiparasitaires, substances vaccinantes, immunomodulateurs et analgésiques.

16. Particules selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisées en ce qu'elles comprennent jusqu'à 95 % en poids d'une matière active.

30 17. Particules selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisées en ce qu'elles possèdent une taille variant de 50 nm à 600 μ m et en particulier de 80 nm à 250 μ m.

18. Particules selon l'une quelconque des revendications 1 à 17, caractérisées en ce qu'il s'agit de nanoparticules.

19. Particules selon l'une quelconque des revendications 1 à 17, caractérisées en ce qu'il s'agit de microparticules.

5 20. Particules selon l'une quelconque des revendications 1 à 19, caractérisées en ce qu'elles sont obtenues par la technique d'émulsion/évaporation du solvant en utilisant à titre d'agent stabilisant d'émulsion au moins ledit hyaluronane amphiphile.

21. Vecteur biologique caractérisé en ce qu'il comprend au moins des particules selon l'une quelconque des revendications 1 à 20.

10 22. Utilisation de particules selon l'une quelconque des revendications 1 à 20, ou d'un vecteur selon la revendication 19 pour encapsuler au moins une matière active.

23. Utilisation de particules selon l'une quelconque des revendications 1 à 20 ou d'un vecteur selon revendication 21 pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement de l'arthrose.

15 24. Composition pharmaceutique ou de diagnostic comprenant au moins des particules selon l'une quelconque des revendications 1 à 20 ou un vecteur selon la revendication 21, associé(es) le cas échéant à au moins un véhicule pharmaceutiquement acceptable et compatible.

25. Utilisation de hyaluronane ou dérivé à titre d'agent de ciblage en surface de particules ou de capsules.

26. Utilisation selon la revendication 25, caractérisée en ce que le hyaluronane est un hyaluronane tel que défini en revendications 1 à 8.

27. Utilisation selon la revendication 25 ou 26, caractérisée en ce que les particules ou capsules sont des nano- ou micro-sphères ou des nano- ou micro-particules.

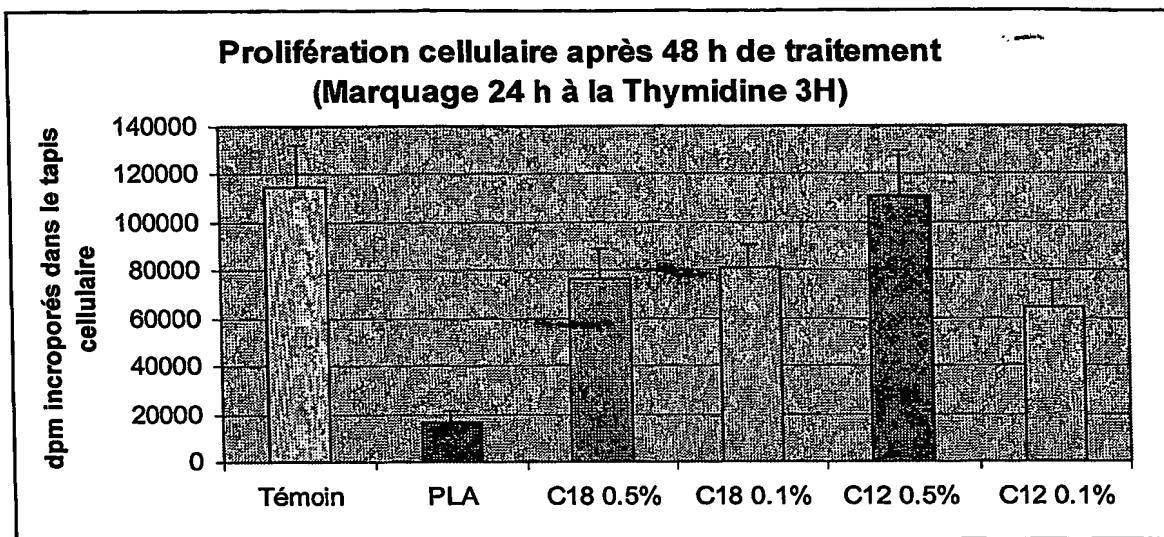
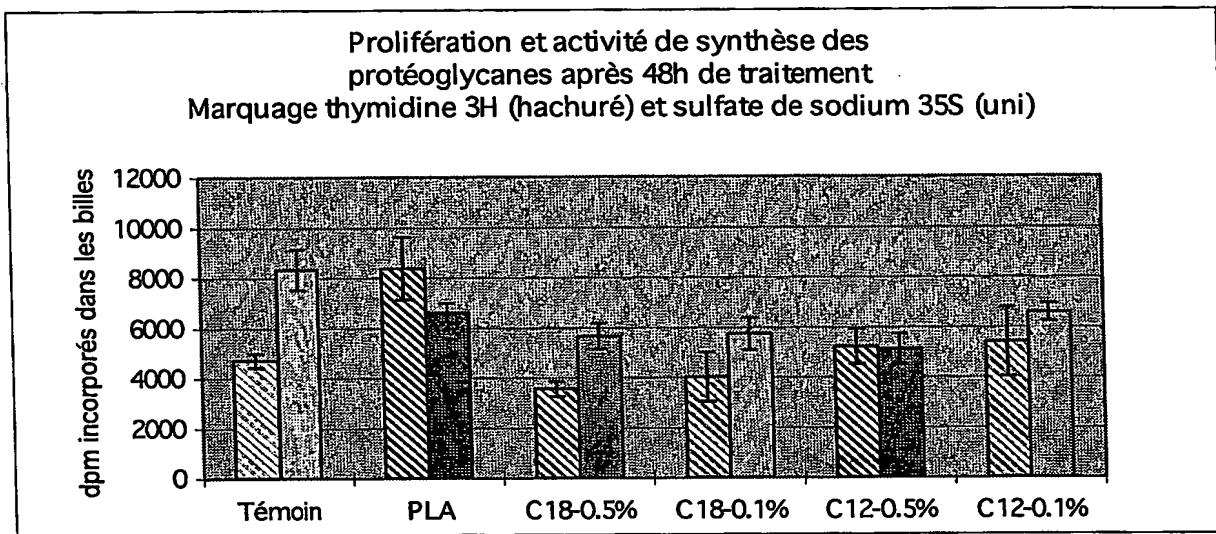
Figure 1

Figure 2

International Application No
PCT 03/02299A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 A61K9/51 A61K9/16

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

WPI Data, PAJ, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 98 48783 A (POINT BIOMEDICAL CORPORATION, U.S.A.) 5 November 1998 (1998-11-05) claims 1,4,9,34,36,38-41,52,53 page 9, line 9 - line 33 page 5, line 6 - line 34 page 6, line 10 - line 33 page 7, line 11 - line 15 page 11, line 33 -page 12, line 9 ---	1-27
A	WO 01 88019 A (CNRS) 22 November 2001 (2001-11-22) claims ---	1-27 -/-

 Further documents are listed in the continuation of box C. Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *&* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

12 December 2003

Date of mailing of the international search report

23/12/2003

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Scarpioni, U

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/US 93/02299

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 95 03357 A (MASSACHUSETTS INSTITUTE OF TECHNOLOGY, U.S.A.) 2 February 1995 (1995-02-02) claims page 7, line 25 - line 29 -----	1-27
A	WO 96 20698 A (UNIVERSITY OF MICHIGAN) 11 July 1996 (1996-07-11) claims 1-9, 12, 29-33, 45 -----	1-27
A	EP 0 576 675 A (FUJISAWA PHARMACEUTICAL CO. LTD., JP) 5 January 1994 (1994-01-05) claims page 2, line 45 -page 3, line 11 -----	1-27

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/03/02299

Patent document cited in search report		Publication date		Patent family member(s)		Publication date
WO 9848783	A	05-11-1998		AU 739919 B2 AU 7173098 A DE 19882362 T0 EP 0979071 A1 GB 2340040 A ,B JP 2001527547 T NO 995313 A US 6193951 B1 WO 9848783 A1 US 2001012522 A1		25-10-2001 24-11-1998 18-05-2000 16-02-2000 16-02-2000 25-12-2001 29-12-1999 27-02-2001 05-11-1998 09-08-2001
WO 0188019	A	22-11-2001		FR 2809112 A1 AU 6242701 A CA 2408870 A1 EP 1285021 A1 WO 0188019 A1		23-11-2001 26-11-2001 22-11-2001 26-02-2003 22-11-2001
WO 9503357	A	02-02-1995		US 5543158 A US 5565215 A CA 2167920 A1 CA 2167921 A1 EP 0710261 A1 EP 0712421 A1 JP 9504308 T JP 9504042 T WO 9503356 A1 WO 9503357 A1 US 5578325 A		06-08-1996 15-10-1996 02-02-1995 02-02-1995 08-05-1996 22-05-1996 28-04-1997 22-04-1997 02-02-1995 02-02-1995 26-11-1996
WO 9620698	A	11-07-1996		AT 252894 T AU 4755696 A CA 2207961 A1 DE 69630514 D1 EP 0805678 A1 JP 10511957 T WO 9620698 A2		15-11-2003 24-07-1996 11-07-1996 04-12-2003 12-11-1997 17-11-1998 11-07-1996
EP 576675	A	05-01-1994		EP 0576675 A1 WO 9216191 A1 US 5654009 A		05-01-1994 01-10-1992 05-08-1997

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No

PCT/03/02299

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 7 A61K9/51 A61K9/16

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

WPI Data, PAJ, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	WO 98 48783 A (POINT BIOMEDICAL CORPORATION, U.S.A.) 5 novembre 1998 (1998-11-05) revendications 1, 4, 9, 34, 36, 38-41, 52, 53 page 9, ligne 9 - ligne 33 page 5, ligne 6 - ligne 34 page 6, ligne 10 - ligne 33 page 7, ligne 11 - ligne 15 page 11, ligne 33 -page 12, ligne 9 ---	1-27
A	WO 01 88019 A (CNRS) 22 novembre 2001 (2001-11-22) revendications ---	1-27 -/-

Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- *T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- *X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- *Y* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- *&* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

12 décembre 2003

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

23/12/2003

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Scarpone, U

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No
PCT [REDACTED] 03/02299

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	WO 95 03357 A (MASSACHUSSETS INSTITUTE OF TECHNOLOGY, U.S.A.) 2 février 1995 (1995-02-02) revendications page 7, ligne 25 - ligne 29 -----	1-27
A	WO 96 20698 A (UNIVERSITY OF MICHIGAN) 11 juillet 1996 (1996-07-11) revendications 1-9, 12, 29-33, 45 -----	1-27
A	EP 0 576 675 A (FUJISAWA PHARMACEUTICAL CO. LTD., JP) 5 janvier 1994 (1994-01-05) revendications page 2, ligne 45 -page 3, ligne 11 -----	1-27

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No
PCT/03/02299

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9848783	A 05-11-1998	AU 739919 B2 AU 7173098 A DE 19882362 T0 EP 0979071 A1 GB 2340040 A ,B JP 2001527547 T NO 995313 A US 6193951 B1 WO 9848783 A1 US 2001012522 A1	25-10-2001 24-11-1998 18-05-2000 16-02-2000 16-02-2000 25-12-2001 29-12-1999 27-02-2001 05-11-1998 09-08-2001
WO 0188019	A 22-11-2001	FR 2809112 A1 AU 6242701 A CA 2408870 A1 EP 1285021 A1 WO 0188019 A1	23-11-2001 26-11-2001 22-11-2001 26-02-2003 22-11-2001
WO 9503357	A 02-02-1995	US 5543158 A US 5565215 A CA 2167920 A1 CA 2167921 A1 EP 0710261 A1 EP 0712421 A1 JP 9504308 T JP 9504042 T WO 9503356 A1 WO 9503357 A1 US 5578325 A	06-08-1996 15-10-1996 02-02-1995 02-02-1995 08-05-1996 22-05-1996 28-04-1997 22-04-1997 02-02-1995 02-02-1995 26-11-1996
WO 9620698	A 11-07-1996	AT 252894 T AU 4755696 A CA 2207961 A1 DE 69630514 D1 EP 0805678 A1 JP 10511957 T WO 9620698 A2	15-11-2003 24-07-1996 11-07-1996 04-12-2003 12-11-1997 17-11-1998 11-07-1996
EP 576675	A 05-01-1994	EP 0576675 A1 WO 9216191 A1 US 5654009 A	05-01-1994 01-10-1992 05-08-1997

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.